

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 5 月 2 日 (02.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/34885 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 1/38, 5/08, C07K 14/435, 1/30, D06M 11/00, A61L 15/20, 27/36, A61K 7/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02250
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 22 日 (22.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2000-324034
2000 年 10 月 24 日 (24.10.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台二丁目1番地2 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田弘生 (YAMADA, Hiromi) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4-8-3-4-205 Ibaraki (JP). 高須陽子 (TAKASU, Yoko) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日2-21-2 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 白崎真二 (SHIRASAKI, Shinji); 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1丁目29番21号 みかどビル5階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CN, IN, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 坪内紘三 (TSUBOUCHI, Kozo) [JP/JP]; 〒302-0102 茨城県北相馬郡守谷町松前台6丁目15-8 Ibaraki (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SERICIN-CONTAINING MATERIAL, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: セリシン含有素材、その製造方法及びその使用方法

(57) Abstract: The physiologically active functions of components constituting undecomposed sericin are clarified to thereby provide novel medical materials, cosmetic materials, etc. with the use of these functional components. A cell growth promoter mainly comprising sericin having a molecular weight determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of about 400,000 which is eluted from fibers spun by domesticated silkworms (cocoon filaments, etc.). This cell growth promoter (substance) is highly useful since it can promote cell growth when used in medical materials (wound coatings, vascular endothelium forming materials, organ forming materials), bioengineering materials (cell culture beds) and cosmetic materials (skin care products).

[続葉有]



WO 02/34885 A1



(57) 要約:

本発明の目的は、未分解セリシンを構成する成分の生理活性機能を解明し、その機能成分を利用した新しい医療用材料、化粧品等を提供すること。

家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）から溶出して得られる、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤である。

この細胞生育促進剤（物質）は、医療用として創傷被覆材、血管内皮形成材、臓器形成素材に、バイオ用として細胞培養床素材に、また皮膚ケア用として化粧品素材に使用されることで、細胞生育が促進され極めて有用である。

明 細 書

セリシン含有素材、その製造方法およびその使用方法

技術分野

本発明は、家蚕セリシンを含有してなる細胞育成促進剤に関し、詳しくは医療用材料、細胞培養床素材および化粧用素材に関する。

また、本発明は、家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）から細胞生育機能を有するセリシンを取得する方法に関する。

背景技術

家蚕が吐糸する繊維、つまり繭糸等は、フィブロインとセリシンの2種のタンパクから構成されており、セリシンはフィブロインをコーティングした状態で存在している。

繭は乾繭、煮繭、繰糸等の工程を経た後、精練（脱セリシン）され、精練された絹糸（フィブロイン繊維）は絹織物として利用されてきた。

また、絹糸は天然繊維の中で唯一の長繊維であり、結晶性に優れ、強度が高く、古来より衣料のほかに手術糸としても利用されてきた。

近年絹タンパクは、その固有の機能に着目して様々な用途に利用することが盛んになっている。

絹タンパクを用いた新素材開発はフィブロインが先行したが、近年はフィブロインの成果に基づいて、もう一方の絹タンパクであるセリシンについても研究開発の対象になってきている。

例えば、セリシン加水分解物を基体表面に被覆して成る化粧用粉体（特開平10-226626号公報）、フィブロイン分散液及び

／又はセリシン水溶液を含浸させたセルロース繊維を含んでなる化粧料（特開平 1 1 - 1 5 2 2 0 6 号公報）、セリシン加水分解物を有効成分とする皮膚炎症防止剤（特開平 1 0 - 2 4 5 3 4 5 号公報）、セリシン加水分解物を有効成分とするコラーゲン産生促進剤および老化防止用皮膚外用剤（特開平 1 0 - 2 2 6 6 5 3 号公報）、セリシン加水分解物と酵母分解物を含有する皮膚外用剤（特開平 1 1 - 1 9 3 2 1 0 号公報）、家蚕の絹タンパク（フィブロインおよび／またはセリシン）から作成されたフィルムからなる細胞培養床（箕浦ら「Attachment and growth of cultured fibroblast cells on Silk protein matrices , J. Biomedical Materials Res., Vol. 29, 1215-1221(1995)」）等が報告されている。

一方、繭糸等からセリシンを得る方法として、従来の精練廃液からセリシンを回収する方法では、平均分子量 5 0 , 0 0 0 以下の低分子量のものしか得られなかった（特開平 1 - 1 6 8 9 0 6 号公報、特開平 4 - 2 0 2 4 3 5 号公報等）。

つまり、繭糸中のセリシンは結晶化しているため、ほとんど水に溶けないが、アルカリ性の熱水中で分解することにより、除去されてきた。

最近になって、平均分子量 1 0 0 , 0 0 0 以上の高分子量のセリシンを効率よく取得できるようになり（特開平 1 1 - 9 2 5 6 4 号公報、特開平 1 1 - 1 3 1 3 1 8 号公報等）、また、分子量の低下を抑えるようにして繭糸等からセリシン等を溶出する方法も開発されてきている（特開平 1 1 - 2 2 8 8 3 7 号公報、特開 2 0 0 0 - 3 8 5 1 4 号公報等）。

家蚕のセリシンは、古くから分子量数万から数十万のタンパクの混合物であると言われてきたが、巨大であるために会合や不溶化が

起き易く、取り扱いが困難であった。

そのため、未分解状態での分画・精製がどのようなタンパク成分から構成されているかについては未解決のままであった。

さらに、生理活性などの機能が示唆されている従来の報告でも、ほとんどは抽出段階で低分子化したものであった。

我々は最近、未分解セリシンを抽出と分画に成功したことから、分画して得られたこれらの成分の利用研究が課題となっていた。

本発明は、未分解セリシンを構成する成分の生理活性機能を解明し、その機能成分を利用した新しい医療用材料、化粧品等を提供することを目的とする。

発明の開示

(課題を解決するための手段)

上記課題を解決するために、本発明者らは、先ず、未分解セリシンを構成するセリシンの分子量と生理活性との関連について追跡したところ、未分解セリシンを構成する成分の中で特定の分子量を有するセリシンが、極めて高い細胞生育促進作用を有するという知見を得た。

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、以下の各構成からなる。

すなわち、本発明は、(1)、が吐糸する繊維(繭糸等)から溶出して得られる、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤に存する。

そして、(2)、家蚕が吐糸する繊維(繭糸等)中のセリシンを、尿素水溶液で溶解せしめた後、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリア

クリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量が約 400,000 のセリシンを分離回収する方法に存する。

そしてまた、（３）、４ M 以上の尿素水溶液で溶解せしめることを請求項 2 記載の分離回収する方法に存する。

そしてまた、（４）、家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を、中性塩水溶液で溶解せしめて得られる、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量が約 400,000 のセリシン、および絹フィブロインを含有する細胞生育促進剤に存する。

そしてまた、（５）、粉末状またはフィルム状の形態を有する細胞生育促進剤に存する。

そしてまた、（６）、家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を温和な条件で精練し、低分子量のセリシンを除去することにより得られる、フィブロイン繊維表面が実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量が約 400,000 のセリシン成分により被覆された状態の繊維状素材からなる細胞生育促進剤に存する。

そしてまた、（７）、家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を温和な条件で精練し、低分子量のセリシンを除去することからなる、フィブロイン繊維表面が実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量が約 400,000 のセリシンにより被覆された状態の繊維状素材の製造方法に存する。

そしてまた、（８）、できる限り中性に近い温和な pH 領域で煮沸精練を行うこと繊維状素材の製造方法に存する。

そしてまた、（９）、蚕体内の中部糸腺および前部糸腺の液状絹

を水中に浸漬して得られる、実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤に存する。

そしてまた、（10）、上記に記載の細胞生育促進剤を、皮膚ケア素材としての化粧素材、医療用材料としての創傷被覆用素材、血管内皮形成、臓器形成素材、およびバイオ材料としての細胞培養床素材に使用する方法存する。

（発明の実施の形態）

（1）未分解のセリシンを構成する各種セリシンの分離と同定

（a）未分解セリシンの取得

繭糸等から未分解のセリシンを取り出すための手段として、従来の酸、アルカリ水溶液や酵素処理による溶出方法を用いたのでは、加水分解により分子量が低下するために、これらの溶出方法は採用することができない。

そこで、繭糸等をチオシアン酸リチウム等の中性塩水溶液にフィブロインともども溶解し、フィブロインとセリシンからなる絹タンパク溶液を作成する。

この中性塩水溶液による溶解方法によれば、加水分解による分子量低下を抑制してほぼ未分解のセリシンを含有する絹タンパク溶液を得ることができる。この未分解のセリシンを含有する絹タンパク溶液を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量測定およびセリシンの分別に供する。

（以下、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、SDS－PAGEと省略する。）

上記中性塩水溶液による溶解方法において使用する中性塩としては、チオシアン酸リチウム、臭化リチウム、塩化カルシウム、硝酸カルシウム等が挙げられるが、特にチオシアン酸リチウム、臭化リチウムが好ましい。

繭糸等は、中性塩の濃厚水溶液中に投入され、溶解される。

溶解においては、絹タンパクの分子量低下をできる限り抑制するために、温和な条件を選定する。

中性塩は、50%飽和以上の濃度で使用され、加熱温度は室温～80℃の範囲にする。

80℃を超えると絹タンパクの分子量低下が起こるので、溶解時間や中性塩の種類との兼ね合いもあるが、できるだけ低温であることが好ましい。

溶解時間は1～20分の範囲で、中性塩の種類、温度等の条件を考慮し、完全に溶解し、かつ分子量低下が起こらないよう決定する。

絹タンパクを溶解した中性塩溶液は、透析に付して純粋な絹タンパク水溶液とする。

(b) 電気泳動法による分子量測定

絹タンパクは、電気泳動法によって、2成分のフィブロイン（HおよびL）および4成分のセリシン（a、b、c、およびd）に分離される。

すなわち、繭糸等を上記中性塩水溶液に溶解し、5M（5mol/l）尿素液で置換したものを、還元剤、例えば2-メルカプトエタノール（ME）で処理し、分子間架橋結合（SS結合）を切断する。

これをSDS-PAGEに供して繭糸の構成タンパク各成分の分

子量を測定する。

電気泳動法による測定の結果、繭層セリシンの約 45 % を分子量約 400,000 のセリシン a が、約 34 % を約 250,000 のセリシン d が、約 15.5 % を約 200,000 のセリシン b が、約 5.3 % を約 35,000 セリシン c がそれぞれ占めることを突きとめた。

(2) セリシン a 成分からなる素材の作成；

繭糸等を尿素水溶液中、大気圧下で加熱してセリシン a 成分を溶出する。

尿素水溶液の濃度は 4 M 以上、好ましくは 7 M ～ 飽和で 70 ～ 100 °C に 3 ～ 30 分間好ましくは 5 ～ 30 分間保ち、セリシンを抽出する。

尿素水溶液の濃度は低いほど尿素量が少ないため、コストが少なくてよい。

しかし、尿素濃度が低いと特にセリシン a の溶解が低下し抽出量が少なくなるため、抽出を早く回収量を多くするには 4 M 以上の尿素濃度にする方がよい。

加熱温度が低いと抽出されにくく、高いとセリシンが分解し分子量が下がる。

抽出時間が短いと抽出されにくく、長いとセリシンが分解しやすい。

また、尿素水溶液に 1 % 以上の還元剤 (ME 等) を加えることで、セリシンの回収率は向上する。

以上のようにして得たセリシン溶解液に、容量にして 3 ～ 5 倍量の有機溶媒 (メタノール、エタノール、アセトン等) を加え、未分解セリシンの沈澱を得る。

これを1%以上の還元剤（ME等）を含むチオシアン酸リチウム等の中性塩水溶液に溶解した後、エタノール等の有機溶媒を順次加えて沈澱させ、SDS-PAGEで確認しつつ各種セリシンの分画を行う。

沈澱物の溶解・沈澱の操作を繰り返すことにより、セリシンa含有率が90%以上の絹タンパクを得る。

あるいは、繭糸等をチオシアン酸リチウム等の中性塩水溶液に溶解して得たフィブロインを含む絹タンパク溶液を還元剤（例えばME等）で処理し、次いでエタノール等の有機溶媒による沈澱およびME含有チオシアン酸リチウム水溶液による溶解を繰り返して絹タンパク成分の分別を行うことにより、セリシンa含有率が90%以上の絹タンパクを得る。

溶解と沈澱を繰り返し行って精製されたセリシンaを、チオシアン酸リチウム等の中性塩水溶液に溶解し、透析等で脱塩する。

精製・脱塩されたセリシンa水溶液を噴霧乾燥して粉末状素材を得る。

また、精製・脱塩されたセリシンa水溶液を平板上で乾燥してフィルム状素材を得る。

このフィルム状素材を粉碎して粉末状素材としてもよい。

以上のようにして得られたセリシンa成分からなる粉末状またはフィルム状素材は、バイオ用として細胞培養床素材等に、医療用として創傷被覆材、血管内皮形成材（人工血管）、臓器形成材医療素材等に、また、皮膚ケア用として化粧素材等に、一部あるいは全部として利用できる。

平均粒子径が1～1,000 μ m、好ましくは1～100 μ mであれば、粉末は皮膚等の動きに柔軟に対応でき、創傷被覆剤として

も利用できる。

(3) セリシン a とフィブロインからなる素材の作成；

セリシン a を含有する素材を、特にフィルム状素材として使用する場合には、セリシン a 成分のみからなる素材自体の強度が十分でないために、そのまま創傷被覆材や人工血管等の医療素材等に用いるのは必ずしも望ましくない。

そこで、繭糸を構成するもう一方のタンパク成分であり、生体適合性がよく、強度の優れた絹糸の構成成分であるフィブロインをセリシン a と組み合わせて用いることにより、創傷被覆材や人工血管等の医療素材等により適した素材を得ることができる。

セリシン a とフィブロインを組み合わせて用いる態様としては、絹糸をリチウム塩等の中性塩の水溶液で溶解したフィブロイン水溶液と、セリシン a からなる水溶液とを混合して得られるセリシン a - フィブロイン混合水溶液を用いることができる。

中性塩水溶液としてはチオシアン酸リチウムの 5 M 以上の水溶液、好ましくは 9 M 程度の飽和水溶液が効果的である。

原料タンパクに対し溶媒量が多いほど溶解しやすいが、精製・脱塩等は非効率的になる。

したがって、原料タンパクに対し溶媒量を極力少なくした方が、絹タンパクを効率的に回収できる。

このようなことから原料に対する中性塩水溶液の容量は原料重に対し 7 倍以上、好ましくは 9 ~ 50 倍がよい。

溶液の脱塩は水に対する透析により行う。

透析は、透析外液が A g NO₃ 添加により沈澱を生じなくなるまで行う。

これによって、セリシン a - フィブロイン混合水溶液を得る。

得られた混合水溶液を平板上で乾燥させてフィルム状の素材とする。

フィルムを作る場合は、透析をできるだけすみやかに行うことが好ましく、具体的には3日以内、好ましくは2日以内である。

透析に長い日数をかけると、絹タンパクがゲル化し、塊状となるため、フィルム化が困難になる。

絹タンパク水溶液を平板上、特にアクリル等のプラスチック板上に流し、結晶化度が10%未満となるように、すみやかに乾燥してフィルム化する。

たとえば、60%RH（相対湿度）以下の室内で、送風しながら乾燥するのが好ましい。

結晶化度10%以上のフィルムは吸水性が低いため、創傷部に被覆した時、創傷部の滲出液を十分に吸収できず、柔軟になれないため、むしろ創部を傷つけてしまう。

そのため、創傷被覆材には適さない。

粉末状の素材は、脱塩したセリシンa-フィブロイン混合水溶液を噴霧乾燥させるか、または、混合水溶液を凍結乾燥させるか、もしくはアルコール等により沈澱させ、乾燥後粉碎して得られる。

また、フィルム状の素材を粉碎することによって得ることもできる。

粉末の形状はフィルムと異なるため、粉末の結晶化度は0～100%の範囲で創傷被覆材として利用できる。

(4) セリシンa成分がフィブロイン繊維表面に被覆された繊維状素材；

蘭糸等の原料を精練する際に、水に溶解しやすいセリシンdとbは最初の段階で除かれ、セリシンの40%程度が除かれた段階では

、繭糸の表面はほとんどセリシン a から構成されているから、この段階で精練を終了して得られる生糸を原料とすることが好ましい。

繭糸等の原料を煮沸精練する際は、精練液の pH が中性から離れるほどセリシンは取得しやすいが、この場合、分解して分子量が低下するので、未分解のセリシンを取得するためには、できる限り中性に近い温和な pH 領域で精練を行うことが好ましい。

水で精練する場合には、セリシン a を含む原料を水中に浸漬して行う。

この場合、水温は高い方が効率的で、大気圧下で水を沸騰させることは効果的である。

分子量の低下を防ぐため、煮沸時間は数時間以内、好ましくは 1 時間以内がよい。

セッケンを用いて精練する場合には、たとえば濃度 0.3 % のマルセルセッケンなど、水溶液の pH が 10 以下となるようなセッケンを用いて 1 時間以内、好ましくは 30 分以内の煮沸とする。

セリシン a とフィブロインからなる素材は、セリシン a 含有率が 5 % 以上、好ましくは 20 % 以上であることが好ましい。

繭糸等の原料を上記の方法により精練して、水に溶解しやすいセリシン d, b 等を除去し、繭糸の表面がセリシン a のみで覆われた状態の繊維状素材を、そのまま、或いは織布、不織布等加工し、手術用の糸、創傷被覆材や人工血管等の医療用素材および化粧用素材として用いることができる。

または、表面を主にセリシン a で覆われた繊維状素材を上記 (1) (a) と同様の方法により溶解、脱塩し、絹タンパク水溶液を得る。

これを平板上で乾燥してフィルム状素材を得る。

あるいは噴霧乾燥して粉末状素材を得る。

また、フィルム状素材を粉砕して粉末状素材としてもよい。

以上のようにして得られたセリシン a からなる粉末状またはフィルム状素材は、創傷被覆材、人工血管等の医療素材として、また、皮膚ケア用の化粧素材等の一部あるいは全部として利用できる。

平均粒子径が $1 \sim 1,000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $1 \sim 100 \mu\text{m}$ であれば、粉末は皮膚等の動きに柔軟に対応でき、創傷被覆剤としても利用できる。

本発明でセリシン a (a が 90 % 以上) およびセリシン a を含有する素材を取得するための原料としての繭糸等とは、家蚕の吐糸した繭糸セリシンを含有する物質とする。

繭糸セリシンを含有する物質としては家蚕の繭層、繭糸、生糸、絹織編物等の未精練物、またそれらの不完全精練物およびセリシンを含有する繊維、粉末、フィルム等があり、これらの中でセリシン a が含有されている物すべてを原料として利用できる。

また、フィブロインを含まずセリシンのみを吐糸するセリシン蚕の繭も原料にすることができる。

(5) 蚕体内の中部糸腺および前部糸腺液状絹からのセリシン a およびセリシン a を含有する素材；

吐糸直前の家蚕の絹糸腺を取り出し、水中で絹糸腺を裂いて内容物である液状絹と絹糸腺細胞とを分ける。

絹糸腺は前部、中部、後部に分けらる。

前部、中部絹糸腺の液状絹は直径数 mm の液状フィブロインの周りを液状セリシンが $0.1 \text{ mm} \sim 0.5 \text{ mm}$ の厚さで覆っている。

液状フィブロイン、液状セリシンともに水に溶解するので、前部、中部絹糸腺の液状絹を水中に浸漬しておけば、セリシンとフィブ

ロインの混合水溶液が得られる。

セリシンの方が速く溶解する為、10～30分間の浸漬ではセリシンを多く含む水溶液が得られるが、浸漬時間が長くなるとフィブロインの割合が多くなる。

この水溶液にスプレードライの方法を用いれば、粉末が得られる。

また、凍結乾燥、あるいはアルコール等で沈澱した後に乾燥粉碎すると、粉末が得られる。

また、平板上で乾燥すれば、フィルムが得られ、このフィルムを粉碎すれば粉末が得られる。

(効果)

本発明の、家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）から溶出して得られる、SDS-PAGEによる分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤（物質）は、繭糸等からほぼ未分解で溶出され取得されたものであり、繭糸等を構成するセリシンが有する細胞生育促進作用の実質的な有効成分である。

また、SDS-PAGEによる分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤（物質）は液状絹から得ることも出来る。

この細胞生育促進剤（物質）は、細胞の生育促進作用を有することから、医療用として創傷被覆材，血管内皮形成材，臓器形成素材に、バイオ用として細胞培養床素材に、また皮膚ケア用として化粧品用素材に、使用されると極めて有用である。

図面の簡単な説明

第1図は、繭糸タンパクの電気泳動像である。

第 2 図は、各沈澱物の電気泳動像である。

第 3 図は、分画、精製したセリシンの主要 3 成分（s - d, s - a, s - b）の電気泳動像である。

第 4 図は、繭層タンパクの電気泳動像である。

第 5 図は、抽出セリシンの電気泳動像である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の細胞生育促進剤の上記用途に対する有用性を示すために、それに関する実験（実施例）を行ったので述べることにする。

もっとも、本発明はこれら実施例に限定されることはない。

実施例 1

〔セリシン a の分画、精製〕

光、熱、水等の処理を行っていない吐糸後 1 ヶ月以内の家蚕繭を原料とし、繭層を約 70 %（重量 %）LiSCN（pH 7）水溶液に溶解し、濃度約 5 %の絹タンパク溶液を得た。

この絹タンパク溶液の溶媒を 5 M 尿素水溶液に置換したサンプル（N）と、それに 1 %の 2 -メルカプトエタノール（ME）を添加し、SS 結合を切断したサンプル（R）の SDS - PAGE（2 - 15 % グラジェントゲル）を図 1 に示す。

図 1 は、繭糸タンパクの電気泳動像である。

2 -メルカプトエタノールで還元してある繭糸タンパク（R）と還元していない繭糸タンパク（N）とする。

セリシン（s）、フィブロイン（f）、マーカー（M）とする。

繭糸タンパクはフィブロインとセリシンから成り、SS 結合を切断することで、フィブロインは、2 成分〔H（フィブロイン H 鎖、

及びフィブロインL鎖)に、セリシンは主に4成分(a, b, c およびd)に分かれ、これらを絹タンパクの主成分とみなすことができる。

絹タンパクの各成分は図1のRの電気泳動像の染色濃度から見積もった。

その結果を表1に示す。

表1

セリシン各成分の割合

成 分	割 合 (%)
s-a	45.0
s-d	34.2
s-b	15.5
その他	5.3

セリシンではaとd成分が特に多く、a, b, dの3成分で、セリシンの約95%を占めるので、これら3成分をセリシンの主要成分とした。

次に、前述の5%絹タンパク溶液をMEで還元したもの10mlにエチルアルコール82mlを11回に分けて、順次加えた。

1回ごとに生成した沈澱物を遠心分離して回収した。

各沈澱物の電気泳動像を図2に示す。

図2は、繭糸タンパク溶解液にエタノール添加による11分画物の電気泳動像である。

図2において、セリシンdは第1, 2沈澱物に、セリシンaは第2～5沈澱物に、セリシンbは第2～6沈澱物に、セリシンcは第

10～11沈澱物に存在していることが分かる。

そこで、セリシンの主要3成分をできるだけ高純度で得るため、第1, 3, 4, 5の各沈澱物を別々に1%のMEを含む70%チオシアン酸リチウム水溶液(pH7)に再度溶解し、溶解液にエタノールを順次加え再沈澱させた。

得られた沈澱物の内でセリシンd, a, bのSDS-PAGEを図3に示す。図3は、分画、精製したセリシンの主要3成分(s-d, s-a, s-b)の電気泳動像である。

セリシンd, aおよびbの純度は高くなり、bが少し含まれていると思われるセリシンaにおいても電気泳動像から見積もって純度は90%以上であった。

実施例2

〔セリシン3成分の細胞生育促進作用〕

セリシン3成分について、正常なヒト皮膚由来の線維芽細胞を用いて、細胞生育促進作用の有無を調べた。

線維芽細胞は動物個体内のほとんどすべての組織中に分散して存在し、組織に外傷が加えられたり、臓器の実質細胞が失われた場合、線維芽細胞が分裂増殖して欠落した部分を修復する特徴を有する。

分画精製されたセリシン3成分は70%チオシアン酸リチウム水溶液に溶解し、これを水で透析した。

透析はチオシアン酸イオンの濃度が0.01M以下になるまで行い、これをポリスチレンの細胞培養容器(35mmφ)の底にコートした。

コートは25マイクログラム/cm²の割合で行った。

コートされた容器は生理食塩水で洗浄後、70%エタノールで滅

菌して、細胞培養容器とした。

正常ヒト皮膚由来の線維芽細胞は細胞培養液 1 m l に 2 0 , 0 0 0 個を懸濁させ、2 m l を細胞培養容器に接種した。

5 日間培養後の細胞数をアラマーブルー色素法で測定した。

結果を表 2 に示す。

表 2 ではセリシン a が線維芽細胞の成育を促進していることが分かる。

セリシン d とセリシン b には細胞生育促進作用は認められない。

表 2

セシリン成分の正常ヒト皮膚由来の繊維芽細胞生育促進性

実 験 区	生 育 (%)
対照 (ポリスチレン)	1 0 0 ± 7 . 1
s - a	3 0 5 ± 1 0 . 2
s - d	9 5 ± 1 6 . 5
s - b	1 1 1 ± 7 . 3

実施例 3

〔セリシン a を含有する素材の細胞生育促進作用〕

家蚕の繭層を 8 M 尿素中で、8 0 °C に 1 0 分間保ちセリシンを抽出した。

このセリシンの抽出液にアルコールを加え、セリシンを沈澱させた。

この沈澱物は図 1 のセリシン d , a , b , c から成っている。

このセリシン沈澱物を飽和チオシアン酸リチウム水溶液に溶解し

、脱塩後細胞培養容器の底にコートし、ヒト正常皮膚細胞由来の線維芽細胞の生育促進作用を検討した。

この間の工程は実施例 2 と同じ方法である。

セリシンの各成分を含有する培養床で培養したヒト正常皮膚由来の線維芽細胞生育促進作用については、結果を表 3 に示す。

表 3 のように細胞生育促進作用を持つセリシン a を含有していれば、その素材は細胞生育促進作用を有する。

表 3 の試料はセリシンの各成分（セリシン d, a, b および c）を含有しているが、セリシン a を含有していれば、それ以外のものはフィブロインの成分であってもよい。

また、セリシン a 以外のものは分解していてもよい。

セリシン a の確認は図 1 のように SDS-PAGE のバンドの有無で行う。

表 3

セリシンの各成分（s-d、s-a、s-b、s-c）を含有する培養床で培養したヒト正常皮膚由来の線維芽細胞生育促進作用

実 験 区	生 育 (%)
対照（ポリスチレン）	100 ± 8.3
セリシン各成分を含有する沈澱物	172 ± 13.6

実施例 4

〔絹糸にセリシン a を含有する素材の製造〕

繭糸はフィブロイン繊維の表面をセリシンが覆った状態となっている。

繭糸からセリシン d を除けば、セリシンの約 70 % はセリシン a となる。

そこで、家蚕の繭層を繭層重の 100 倍量の水に浸漬し、煮沸した。

煮沸時間を 5, 10, 15, 20, 30, 60 分をとした時の繭層タンパクの電気泳動像を図 4 に示す。

20 分と 30 分後にはセリシン a とセリシン c のみフィブロイン繊維の表面に残っているが、15 分後ではセリシン b も若干残っている。

一方、セリシン a は繭糸表面から離れ難いが、60 分後には非常に少なくなっている。

また、家蚕の繭層を繭層重の 100 倍量の水に浸漬し、これに 0.2 g のマルセルセッケンを加え煮沸した。

煮沸時間を 5, 10, 15, 20, 30, 60 分として繭層を処理し、処理時間と繭糸表面のセリシン成分を電気泳動で調べた。

その結果、原料の繭層にはセリシンの各成分が見られるが、20 分と 30 分後にはセリシン a とセリシン c のみフィブロイン繊維の表面に残っていた。

60 分後ではセリシン a は非常に少なくなっている。

したがって、繭層を水またはセッケン水中で 10 ~ 60 分程度、好ましくは 15 ~ 40 分程度煮沸すれば、フィブロイン繊維表面のほとんどがセリシン a とすることができる。

実施例 5

〔セリシンの分解〕

家蚕の繭層を 80℃ の 8 M 尿素中に 5 分浸漬してセリシンを抽出した。

このセリシン抽出液を 100℃ で 5, 10, 15, 20, 30, 60 分の各時間処理した。

処理後の繭糸の電気泳動像を図 5 に示す。

セリシン a 成分は d や b 成分より分解速度が速い。

処理時間が 20 分間ではセリシン a 成分は明確に確認できるが、30 分の処理では非常に少なくなり、45 分の処理ではほとんど確認できない。

図 5 は、抽出セリシンの電気泳動像、家蚕の繭層を 80℃ の 8 M 尿素中に 5 分間浸漬してセリシンを抽出し、このセリシン抽出液を 100℃ で 5, 10, 15, 20, 30, 60 分の各時間処理した。

実施例 6

〔動物実験〕

この実施例は、ヘアレス犬〔日本農産工業（株）〕を用いて創傷被覆材としての効果をより詳しく調べたものである。

使用した創傷被覆材として、まず前記実施例 1 で得たセリシン a 成分 90% 以上の沈殿物（a）、および前記実施例 3 で得たセリシン各成分を含有する沈殿物（S）を使用した。

これらの沈殿物は、よく水洗後に凍結乾燥して、粉碎した。

粉末の平均粒子径は 10～20 μm である。

また、前記実施例 4 において、家蚕繭層を水中で 15 分煮沸して得たセリシン a 成分含有絹糸（Fa）についても、動物実験に用いた

。

この場合は水洗後、繊維長を0.5 mm程度以下にに裁断した。

そしてまた、液状絹からセリシン含有フィルム（L-S）を次のように作った。

家蚕（日137×支137号）が吐糸直前となったとき、蚕体をアルコールで消毒し、その絹糸腺を摘出し、水で水洗後に、中部糸腺中区の液状絹を取り出し、水中に浸漬した。

浸漬20分以内の浸漬液をプラスチック板上で室温で送風しながら乾燥し、厚さ30 μmのフィルムを作った。

このフィルムのセリシン含有率は約70%で、水溶性を示す。

以上の他に、比較のため、厚さ40 μmで、セリシンが1.7%、フィブロインが98.3%の水溶性を示すフィルム（A-1）を創傷被覆材としてヘアレス犬で試験した。

このフィルム（A-1）は、本発明者が発明した特許第2990239号における、実施例3の表4に示すA-1のフィルムと同様のフィルム作成工程を経て造られたフィルムである。

また、絹糸を120℃の炭酸ソーダ水溶液に2時間浸漬し、水洗乾燥後、粉碎して得たフィブロイン粉末（F-1.8）〔平均粒子径1.8 μmで水に水溶性を示す〕についても創傷被覆材としてヘアレス犬で試験した。

このフィブロイン粉末は、本発明者が発明した特願平11-259149号における実施例3の表4に示す（3）のフィブロイン粉末と同様の条件で造られたフィブロイン粉末である。

なお、創傷被覆材を使わない場合を対照区とした。

まず、ヘアレス犬の背部皮膚に約1 cm²の大きさに表皮を含め真皮まで剝離し、この創傷部をヒビデン消毒薬で消毒後、動物用抗

生物質ベンジルペニシリンプロカイン〔明治製菓（株）〕を滴下し、各創傷被覆材で被覆した。

さらに、吸収パッド付ポリウレタンフィルム O p S i t e〔スミヤンドネフュー（株）〕で覆った。

さらに、創傷被覆材の脱落を防ぐためにイヌ用ジャケットを着した。

観察

試験開始後 1 週目および 2 週目に、試験部位の観察記録を行った。

その結果を表 4 に示す。

ここで、「炎症部の滲出液の程度」は、――（無し）が治癒の度合いがよいことを示し、また「表皮の再生状態」は+++（非常にある）が治癒度の高いことを示すものである。

いずれの創傷被覆材も対照区より創傷の治癒を促進し、治癒効果があった。セリシン a 成分または a 成分を含有する創傷被覆材（a、s、F a）は比較として使ったアモルファスフィブロインフィルム（セリシン 1.7% 含有）A-1 と同等かそれ以上の治癒効果があった。

被覆材 S と A-1 の治癒効果は、表 4 で示すようにほとんどは同じであるが、S と A-1 を比較すれば S の方が A-1 より治癒効果はあった。

表 4

ヘアレス犬の創傷部に対する被覆材の治癒観察

受傷後 の日数	組織像	創 傷 被 覆 材						
		a	S	Fa	L-S	A-1	F-1.8	対照区
7 日	炎症部の滲 出液の程度	---	-	---	---	-	+	++
	表皮の 再生状態	+	+	+	+	+	-	---
14 日	炎症部の滲 出液の程度	---	---	---	---	---	-	+
	表皮の 再生状態	+++	++	++	++	++	++	+

---：無し、-：ほとんど無し、+：少しある、++：ある、+++：非常にある

産業上の利用可能性

本発明により製造されたこの細胞生育促進剤は、細胞の生育促進作用を有することから、その細胞生育促進剤を期待できる種々の分野、例えば、医療用として創傷被覆材，血管内皮形成材，臓器形成素材に，バイオ用として細胞培養床素材に、また皮膚ケア用として化粧品用素材に、広く使用可能である。

請 求 の 範 囲

1. 家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）から溶出して得られる、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤。
2. 家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）中のセリシンを、尿素水溶液で溶解せしめた後、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンを分離回収する方法。
3. 4M以上の尿素水溶液で溶解せしめることを請求項2記載の分離回収する方法。
4. 家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を、中性塩水溶液で溶解せしめて得られる、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシン、および絹フィブロインを含有する細胞生育促進剤。
5. 粉末状またはフィルム状の形態を有する請求項1, 4記載の細胞生育促進剤。
6. 家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を温和な条件で精練し、低分子量のセリシンを除去することにより得られる、フィブロイン繊維表面が実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシン成分により被覆された状態の繊維状素材からなる細胞生育促進剤。
7. 家蚕が吐糸する繊維（繭糸等）を温和な条件で精練し、低分子量のセリシン成分を除去することからなる、フィブロイン繊維

表面が実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンにより被覆された状態の繊維状素材の製造方法。

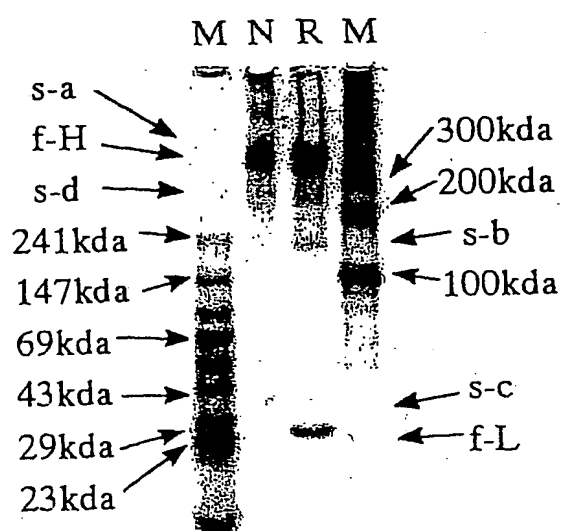
8. できる限り中性に近い温和なp h領域で煮沸精鍊を行うことを特徴とする請求項6記載の繊維状素材の製造方法。

9. 蚕体内の中部糸腺および前部糸腺の液状絹を水中に浸漬して得られる、実質的にドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）による分子量が約400,000のセリシンを主体とする細胞生育促進剤。

10. 請求項1, 4, 5, 6, 又は9に記載の細胞生育促進剤を、皮膚ケア素材としての化粧素材、医療用材料としての創傷被覆用素材、血管内皮形成、臓器形成素材およびバイオ材料としての細胞培養床素材に使用する方法。

FIG. 1

菌糸タンパクの電気泳動像



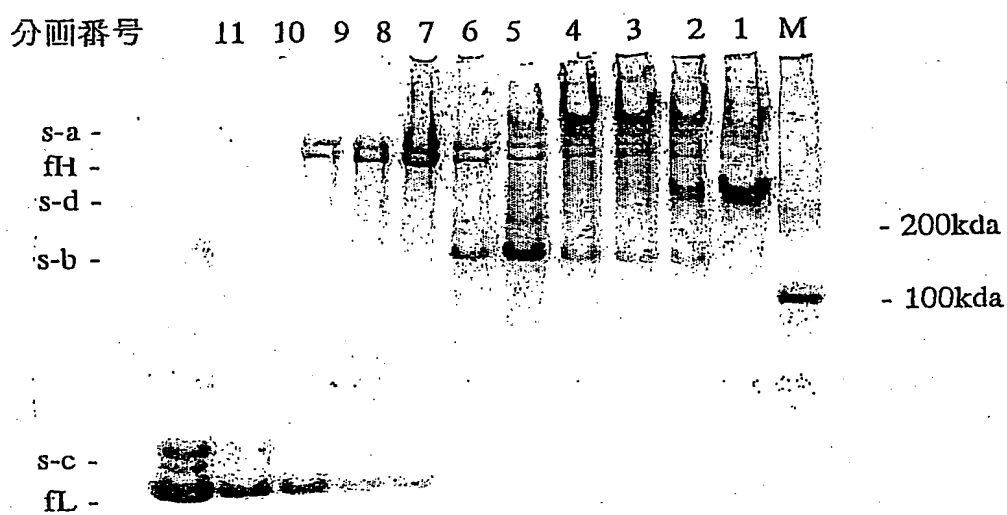
2-メルカプトエタノールで還元してある菌糸タンパク (R) と還元してない菌糸タンパク (N)

s : セリシン
f : フィブロイン
M : マーカー

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 2

繭糸タンパク溶解液にエタノール添加による 11 分画物の電気泳動像

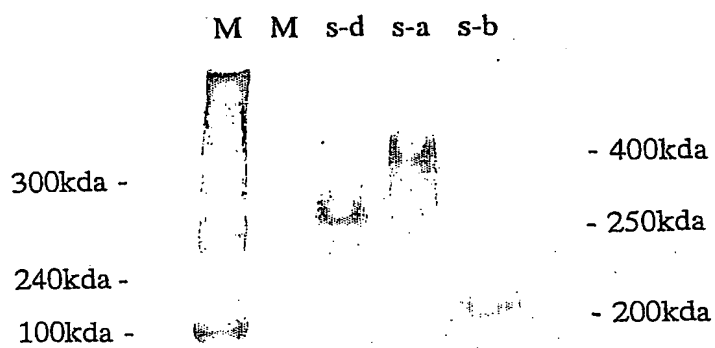


fH, fL : フィブロイン成分
s-a, s-d, s-b, s-c : セリシン成分
M : マーカ

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 3

分画、精製したセリシンの主要3成分(s-a, s-d, s-b)の電気泳動像



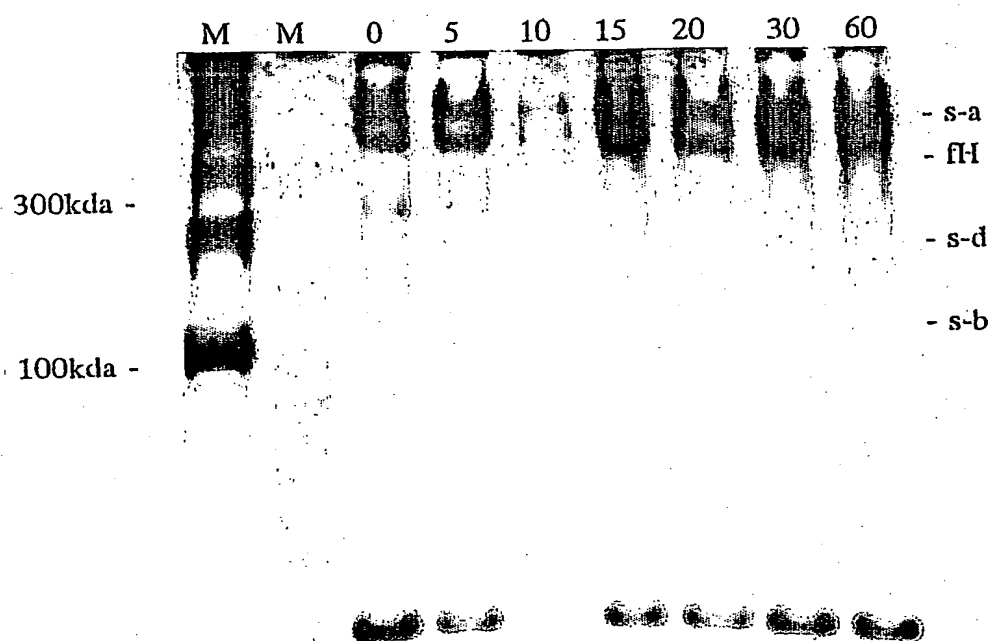
M : マーカー

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 4

繭層の電気泳動像

煮沸時間 (分)



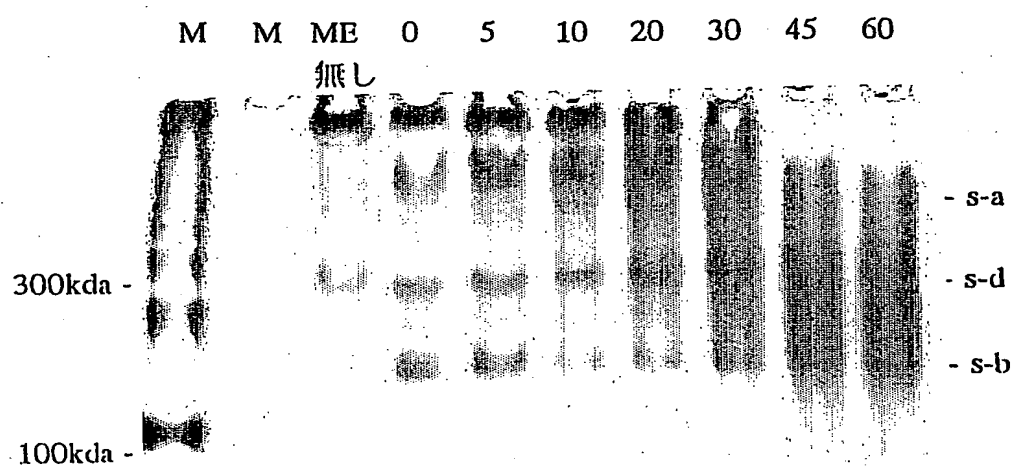
M : マーカ
f H : フィブロイン

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 5

抽出セリシンの電気泳動像

煮沸時間 (分)



M : マーカ
f H : フィブロイン

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N1/38, C12N5/08, C07K14/435, C07K1/30, D06M11/00, A61L15/20, A61L27/36, A61K7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N1/38, C12N5/08, C07K14/435, C07K1/30, D06M11/00, A61L15/20, A61L27/36, A61K7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 11-243948, A (National Institute of Sericultural & Entomological Science, Inoue Kuniyo, Wakenyaku K.K.), 14 September, 1999 (14.09.99) (Family: none)	1-10
Y	Voegeli R., "Sericin no Hifu Hohitsu, Kou Shiwa Kouka", Vol.26, (1998), No.4, pages 70 to 74	1-10
Y	JP, 8-268905, A (Takayuki NAGASHIMA), 15 October, 1996 (15.10.96) (Family: none)	6-10
Y	JP, 1-55191, A (Norin Suisansyo Sanshi Shikenjyou), 02 March, 1989 (02.03.89) (Family: none)	9,10
Y	JP, 11-152206, A (Itakusan Sangyo K.K.), 08 June, 1999 (08.06.99) (Family: none)	10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2001 (16.05.01)

Date of mailing of the international search report
12 June, 2001 (12.06.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02250

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 98/57676, A (Japan National Institute Sericultural & Entomological Science, Kozo TSUBOUCHI, Norinsuisansho Sanshi Konchu), 23 December, 1998 (23.12.98) & EP, 920875, A & CN, 1229362, A & US, 6175053, A & TW, 397693, A & JP, 11-70160, A	10
A	JP, 11-92564, A (National Institute of Sericultural & Entomological Science, Kozo TSUBOUCHI, Hiroo YAMADA, Yoko TAKASU), 06 April, 1999 (06.04.99) (Family: none)	3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/38, C12N5/08, C07K14/435, C07K1/30, D06M11/00, A61K15/20, A61L15/20, A61L27/36, A61K7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/38, C12N5/08, C07K14/435, C07K1/30, D06M11/00, A61K15/20, A61L15/20, A61L27/36, A61K7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 11-243948, A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長、井上國世、和研薬株式会社) 14.9月.1999(14.09.99) ファミリーなし	1-10
Y	Voegeli R., "セリシンの皮膚保湿・抗シワ効果", Vol. 26(1998), No. 4, p. 70-74	1-10
Y	JP, 8-268905, A (長島孝行) 15.10月.1996(15.10.96) ファミリーなし	6-10
Y	JP, 1-55191, A (農林水産省蚕糸試験場長) 2.3月.1989(02.03.89) ファミリーなし	9, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.05.01

国際調査報告の発送日

12.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 11-152206, A (箔山産業株式会社) 8. 6月. 1999 (08. 06. 99) ファミリーなし	1 0
Y	WO, 98/57676, A (JAPAN NAT INST SERICULTURAL & ENTOMOLOGI, TSUBOUCHI K, NORINSUISANSHO SANSHI KONCHU) 23. 12月. 1998 (23. 12. 98) & EP, 920875, A & CN, 1229362, A & US, 6175053, A & TW, 397693, A & JP, 11-70160, A	1 0
A	JP, 11-92564, A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長、坪内紘三、 山田弘生、高須陽子) 6. 4月. 1999 (06. 04. 99) ファミリーなし	3